

塩基性アミノ酸類の分離精製に関する研究

著者	林 弘一
号	26
発行年	1967
URL	http://hdl.handle.net/10097/12577

氏 名 (本籍) はやし 林 こう 弘 いち 一 (福島県)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 2 6 号

学位授与年月日 昭和 4 3 年 1 月 1 1 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭和 3 0 年 3 月
東北大学農学部卒業

学位論文題目 塩基性アミノ酸類の分離精製に関する
研究

論文審査委員 (主 査)
教授 志 村 憲 助 教授 玉 利 勤 治 郎

教授 高 橋 甫

論文内容要旨

林 弘 一

本研究の目的

緣

直接の動機は現在広く使われている糖液の塩基性アミノ酸を供給することにあつた。そこで蛋白質を加水分解して各塩基性アミノ酸を工業的に単離するに必要な種々の知見の蓄積を行うことにした。

一つの分離系列から同時に三つの塩基性アミノ酸を精製，収得するにあつて工業原料として脱脂大豆を選択した。過去における分離法，合成法，発酵法（研究開始の時点には未だ出現していなかつた）に関する文献やそれ等の歴史的背景を考慮しながら、今後における塩基性アミノ酸の医薬，食品及び飼料としての用途の重大性を認識し、種々徹底的に検討した結果イオン交換樹脂を用いて一連の系統だつた分離法を確立することを目的とした。

それに際して、特に医薬用アミノ酸は結晶として収得することが絶対に必要である。その為に溶解度を中心とする物性値が充分知見として蓄積される必要があり、この点に関しては過去の文献に於ける記載は極めて少く、むしろ皆無といつてもよい状態であつた。

従つて、この面での新たな基礎的研究はアミノ酸製造を工業化するにせまられた大きな問題であつた。

本研究においてそれらを検討し、解決してその基礎的研究の上に過去の知見を取り入れながら系統だつた分離精製法を確立した。

本研究の構成

第一章 緒 論

第二章 イオン交換樹脂に対するアミノ酸の挙動

- § 1. イオン交換樹脂のアミノ酸に対する交換容量
- § 2. イオン交換樹脂におけるアミノ酸の吸着平衡について
- § 3. 脱色樹脂に対するアミノ酸の挙動
- § 4. イオン交換樹脂の水和作用
- § 5. アミノ酸塩酸塩の遊離化
- § 6. イオン交換樹脂の赤外線吸収スペクトル

第三章 アミノ酸の定量

- § 1. Lーリジンの脱炭酸法による定量
- § 2. Lーオルニチンの定量
- § 3. Dーアミノ酸の定量

第四章 天然蛋白質加水分解液より塩基性アミノ酸の分離

- § 1. 蛋白質原料及加水分解条件
- § 2. 蛋白質加水分解液から塩基性アミノ酸区分の分離と塩基性アミノ酸区分から各塩基性アミノ酸の分離
- § 3. ヒスチジンの結晶性状改善

第五章 塩基性アミノ酸の物理化学的性質

- § 1. 各PHにおけるイオン型の消長と滴定曲線
- § 2. アミノ酸の溶解度
- § 3. アミノ酸の結晶水
- § 4. 旋光度について
- § 5. 屈 折
- § 6. 赤外線吸収スペクトル
- § 7. X線回析図形

第六章 本研究全般の綜括

本研究の要旨

I 緒論（省略 本研究の目的に含まれる）

II イオン交換樹脂に対するアミノ酸の挙動

本研究のうち最も勢力をかけて研究したもの一つであつてイオン交換樹脂（以下樹脂と呼ぶ）として強酸性，中酸性，弱酸性及び強塩基性，中塩基性，弱塩基性及び脱色樹脂を網羅し、蛋白質を構成している主たるアミノ酸全部について吸着性，吸着能力（交換容量）をしらべ、その全ぼうを明らかにし定量的扱いを可能にしたのは、本実験において初めてである。

この点において従来の M. Partridge の displacement chromatography や W. H. Stein & S. Moore の Elution Analysis と分離に関する考え方が異なつてゐることを後程説明する。かくして塩基性アミノ酸の位置づけを行つた。吸着時の塩基性アミノ酸のイオン型はカチオン樹脂については両性一価カチオンと二価カチオン型で吸着する可能性はあるが、交換容量等から両性一価カチオンと推定した。（TABLE—1）

アミノ酸のイオン交換樹脂に対する吸着量は平衡実験等から、その等電点において最大であることが計算の裏付けをもつて実証された。（Fig.3）又脱色樹脂においてはアミノ酸の挙動は活性炭における場合と極めて類似した動きを示すことが判明した。Arg, Lys, His についてみると吸着量はイオン型から

$R^{\pm} > R^{-} > R^{\mp} > R^{+}$ の順で吸着すること及び濃度の影響は大凡 Freundlich の式に従つて吸着することより分子吸着であると結論した。

（Fig.1 及び 2）

TABLE-1 イオン交換樹脂に対するアミノ酸の吸着性（交換性）

樹脂の種類 \ アミノ酸		塩基性アミノ酸	中性アミノ酸	酸性アミノ酸
酸性	強	++	++	+
	中	+	± (但し、芳香族+)	±
	弱	+	—	—
塩基性	強	+ (但しArg—)	++	++
	中	±	± (但し、芳香族+)	++
	弱	—	—	+

$\left\{ \begin{array}{l} ++ \cdots \cdots \text{交換容量に近い吸着能を示すもの} \\ + \cdots \cdots \text{普通に吸着するもの} \\ \pm \cdots \cdots \text{わずかに吸着するもの} \\ - \cdots \cdots \text{吸着しないもの} \end{array} \right.$

○ アミノ酸吸着の最大点（強酸，強塩基，脱色樹脂共通）

式から

$$\frac{df(x)}{dX} = 1 - \frac{K_1 K_2}{X^2} = \frac{1}{X^2} (X^2 - K_1 K_2)$$

$$X = \sqrt{K_1 \cdot K_2}$$

$$PH_I = \frac{PK_1 + PK_2}{2}$$

$$H_I^+ = \sqrt{K_1 K_2}$$

これはアミノ酸の等電点である。

Ⅲ アミノ酸の定量

本研究を進捗させるに最も重要な鍵をにぎるアミノ酸の定量法の確立につとめた。

Arg 及び His については従来の優秀な比色法（坂口反応，Pauli 反応）があるので問題を Lys 定量にしばつた。定量法として適当な量を迅速に処理しうる方法として *Bacterium cadaveris* によるワールブルグ法を取り上げた。（この菌は Lys を脱炭酸することは知られていた）従来、未検討の酵素性状，反応速度について鋭意追求し定量法として確立した。

又、Lys と homologue である L-Orn に対して適応的に脱炭酸能を与えることができた。更に D-アミノ酸の光学的純度を測定する為に豚の Kidney に存在する D-アミノ酸々化酵素を利用して実際に 31 種類の D-アミノ酸を使用して定量の可能性を追求した。

TABLE-2 D-アミノ酸の反応性

群	D-アミノ酸	酸素吸収	反応速度	range of optPH
1	アラニン フェニルアラニン アスパラギン酸 プロリン システイン チロシン メチオニン バリン イソロイシン	定量的	極めて速やか (30分以内)	7.5 ~ 9.5
2	アルギニン ロイシン アロイソロイシン ノルバリン アロハイドロキシプロリン グルタミン酸 トリプトファン	定量的	比較的速い (60分以内)	8.5 ~ 9.3
3	α-アミノ酪酸 ホモセリン シトルリン オルニチン ホモシステイン スレオニン	非定量的	極めて遅い	狭い
4	ヒスチジン セリン	非定量的	遅い	狭い

IV 脱脂大豆蛋白質から塩基性アミノ酸の分離

まず塩酸による加水分解条件を決定した。

ついで樹脂として強酸性樹脂を用いて塩基性アミノ酸区分の粗分離及び弱酸性樹脂によつて第Ⅱ項で検討したアミノ酸の交換能に応じたカラムの系統的使用法によつて各塩基性アミノ酸の単離に成功した。

この間塩基性アミノ酸区分の分離には、アミノ酸相互にクロマトグラフィーを行わしめる所謂 押し出し法と著者が称している方法を採用し、又弱酸性樹脂の溶出には従来あまり用いられないアンモニアが極めて有効な溶出剤であることをつきとめた。

各塩基性アミノ酸の粗結晶には非天然型のD-体を全体に対して2%程度含有されている事実を確認した*。従つて光学精製法を検討し、第五項の物性を含めて活性体を純度良く高収率で収得しうる工業的な塩基性アミノ酸の分離法を確立した。

* 蛋白質を塩酸加水分解したものより塩基性アミノ酸のDL-体を収得したのは本研究において初めてである。

TABLE-3 塩基性アミノ酸区分の調製

(押し出し法, Duolite C-25 貫流比 $TN/RC=2.1:149/1.5\text{ml/l}=1.0$)

	塩基性アミノ酸区分	漏 出 液	加水分解液
Lys·HCl	1.003	0.021	0.514
His·HCl·H ₂ O	0.605	trace	0.228
Arg·HCl	1.050	0.001	0.532
Glu	0.021	1.512	0.211
Asp	0.009	1.113	0.751

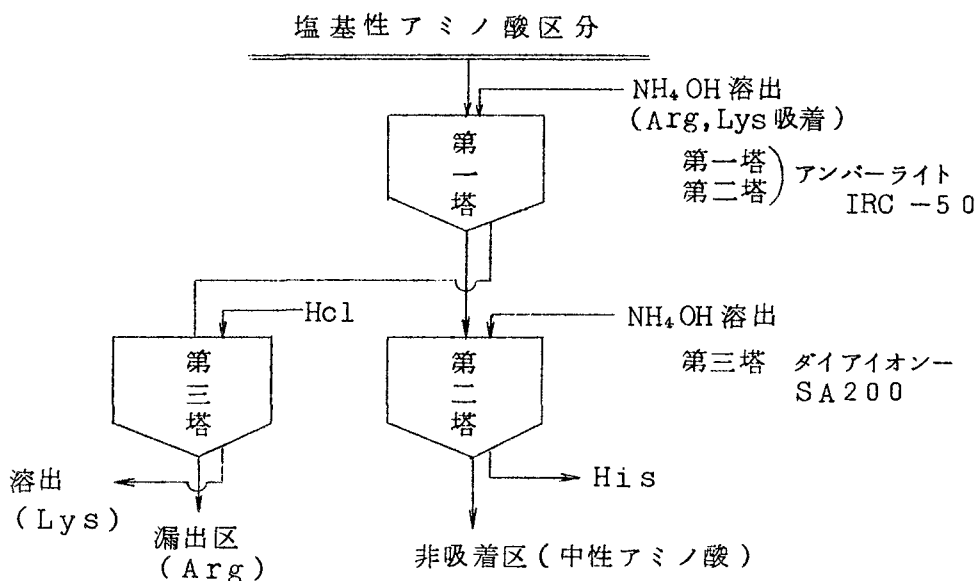
TN/RC=2.1にする理由

- 1) 一定樹脂量当りの塩基性アミノ酸区分の吸着量が最大となる
- 2) 塩基性アミノ酸区分その後の処理工程において後述する弱酸性イオン

交換樹脂に吸着させる際、阻害となる酸性アミノ酸残留率が僅少である。

- 3) 塩基性アミノ酸の漏出区分への損失がまだ問題にならない。

Fig. 4 塩基性アミノ酸区分より各アミノ酸の単離



○ Histidine の光学精製 (Fig.5, Fig.6: ref)

Histidine の光学精製については化学的方法はあるが、溶解度を利用した方法は本研究が初めてである

TABLE-4 L-His及びDL-Hisの混合系より収得可能な各結晶の移行率

No.	原料組成 L-体:DL-体	塩酸系		遊離系	
		光学的性質	移行率	光学的性質	移行率
1	10:1	L-His·HCl·H ₂ O	99%	L-His	—
2	10:1.34	"	98.1	L-His+DL-His	—%
3	10:2	"	96.8	DL-His	33.0
4	10:5	"	92.8	"	73.2
5	10:10	"	85.8	"	86.6

L-His 及び DL-His の混合系より取得可能な各結晶の移行率

No.	原料組成 L-体:DL-体	塩 酸 系		遊 離 系	
		光学的性質	移行率	光学的性質	移行率
6	5 : 10	L-His · HCl · H ₂ O	71.6	DL-His	91.3
7	2 : 10	"	27.0	"	93.3
8	1.44 : 10	L-His · HCl · H ₂ O +DL-His · HCl · 2H ₂ O	—	"	98.1
9	1 : 10	DL-His · HCl · 2H ₂ O	—	"	99

○ His の結晶の性状改善

His は一度活性炭脱色を行つても晶析工程で再び着色することが多く、その原因は主として溶存酸素（これは活性炭から由来するものが多い）によることが判つた。検討の結果酸化還元電位を用いて管理し、この電位を一定 limiting potential 以下に抑える様にすれば良好な結晶がとれることがつきとめられた。＊具体的には SO₂ 水等による還元剤を添加する。そのとき期待できる効果は

1. 結晶の臭いの改善
2. 結晶の着色防止
3. 菌の生育阻止（好気性菌は電位レベル + 200 mV (PH 7.0) 以上
嫌気性菌は -200 mV (PH 7.0) 以下で生育可能）

菌の生育は医薬用アミノ酸を調製するときには Pyrogen 物質の混入となつてあらわれ不良品となる。

＊この様な概念の導入はアミノ酸の結晶化に於いては初めてである。

V 塩基性アミノ酸の物理化学的性質

アミノ酸の物性を知ることは結晶化，商品化の過程において最も基本的な問題であつて著者はこの研究中最大の努力を注いだ所である。

○ 溶解度

溶解度については文献は前述した様に皆無といつてよく、この面のデータ蓄積を行い、又塩基性アミノ酸は通常4つのイオン型をもつ所から絶えずイオン型を念頭におきながら問題を進めた。

Fig.7 PHとArgのイオン型の消長→ 別紙

$$\begin{aligned}
 R^{\pm} ; \text{遊離型} & \begin{cases} \text{L-Arg} & \log S = 0.9770 + 0.01345t \\ \text{L-His} & \log S = 0.3627 + 0.00905t \end{cases} \\
 R^{\pm} ; \text{一塩酸塩} & \begin{cases} \text{L-Arg} \cdot \text{HCl} & \log S = 106532 + 0.01301t \\ \text{L-Lys} \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O} & \log S = 1.6990 + 0.01294t \\ & (0^\circ \sim 55^\circ\text{C}) \\ \text{L-Lys} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O} & \log S = 1.4631 + 0.00508t \\ & (55^\circ\text{C以下}) \end{cases} \\
 R^{\pm} ; \text{二塩酸塩} & \begin{cases} \text{L-Lys} \cdot 2\text{HCl} & \log S = 2.2138 + 0.00409t \\ \text{L-His} \cdot 2\text{HCl} & \log S = 1.9685 + 0.00265t \end{cases} \\
 & t = 0^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C} \\
 & S = g/100g \text{ H}_2\text{O}
 \end{aligned}$$

その他三成分不均一平衡及び酸・アルカリに対する溶解度についてもしらべた。共通な性質として溶解度は酸・アルカリと共に増加するが、酸側は最大点をもち又低下してくる。(Fig.8.9.10)

○ 結晶水の性質(主として脱水点); 示差熱天秤分析によるモデルとしてFig.11及びFig.12に示差熱分析曲線を掲げる。

TABLE-5 塩基性アミノ酸及びその塩類の結晶水の脱水温度

	脱水温度	結晶水の型
L-Arg · 2H ₂ O	50 °C	Z
L-Arg : L-Asp · H ₂ O	88	F
L-Arg : L-Glu · 3H ₂ O	82	Z
L-His · HCl · H ₂ O	144	—
DL-His · HCl · 2H ₂ O	100 & 144	C.F
L-Lys · HCl · 2H ₂ O	50	Z
L-Lys · L-Glu · 2H ₂ O	85	Z.F
L-Orn · L-Asp · H ₂ O	61	F
L-His · HBr · H ₂ O	120	—
DL-Arg · HCl · H ₂ O	107	—

Z フツ石水型

F …… 新たに結晶水を有することが判つたもの

G …… 硫酸銅型

その他17種の中酸性アミノ酸及びその塩類についても同性質を解明し乾燥条件の一助とした。結晶水の脱水点について明確にしたのは本実験に於いて初めてである。

o 旋光度について

比旋光度は個々の物性を特徴づける重要な性質であり、Van't Hoff の説によると存在する活性イオン部分旋光の累積であるから、各PHによつて旋光度が変わることが推測される。

Arg, Lys, Hisについてはアルカリ側NaOH/A, Acids 4モル比→酸性側HCl/A・Acids 4モル比の間において、ほぼLutz & Firgensen' rule があてはまることが判つた。

TABLE—6 各イオン型による比旋光度 ($[\alpha]_D^{20}$)

	Arg	Lys	His
2価カチオン (R^{++})	+27.2°	+26.0°	+14.0°
両性一価カチオン (R^{+})	+16.0°	+15.0°	+ 2.5°
両性イオン (R^{\pm})	+12.5°	+13.1°	—4.5°
アニオン (R^{-})	+12.0°	+14.5°	— 4.0°

又、各アミノ酸について等電点よりカチオン側（酸性側）について溶質及び溶媒の濃度による比旋光度に及ぼす影響をTABLE—7 にまとめて示す。又、その結果、推奨すべきと考えられる測定条件をTABLE—8 に示す。

TABLE-7 アミノ酸及び溶媒濃度の増加による
比旋光度に与える一般的傾向

アミノ酸	アミノ酸濃度の影響	比率	塩酸濃度の影響	比率
L-Arg	不 変	—	やゝ直線の上昇	0.30
L-His	若干宛減少	—	不 変	—
L-Lys	やゝ増加の傾向	—	やゝ上昇の傾向	—
L-Ala	直線の上昇	—	直線的減少	—
L-Lys	直線の下降	—	直線的下降	—
L-Glu (NH ₂)	若干の変化	—	若干の変化	—
L-Hypro	減少（絶対値は増加）；HCl 不変；H ₂ O	—	減 少	—
L-Ileu	直線の上昇	0.14	直線的増加	0.84
L-Leu	直線の上昇	0.17	直線的増加	0.62
L-Met	直線の上昇	0.15	上昇，一定値になる	—
L-phe	若干の変化	—	直線的に減少	—
L-pro	若干の変化	—	直線的に減少	—0.6
L-Ser	一部上昇	—	凹型曲線を描く	—
L-Thr	直線的減少 (HCl)	—	—	—
L-Try	不 変	—	上 昇	—
L-Tyr	直線的減少	—	直線的増加	—0.24
L-Val	直線的増加	0.12	直線的増加	0.74

TABLE—8 推奨すべき比旋光度の測定条件と参考値
(実用的範囲)

アミノ酸	測定条件		参考値
	アミノ酸濃度	溶媒	比旋光度
L-Ala	C=10 C=10	(6NHCl 6NHCl	+14.7° +15.5°
L-Arg·HCl	C=8	6NHCl	+22.5°
L-Asp	C=10	2 to 3 NHCl	+26.2°
L-Cys	C=2	1NHCl	+22.3°
L-His·HCl·H ₂ O	C=10	6NHCl	+ 9.3°
L-Hypro	C=4	H ₂ O	-75.1°
L-Ileu	C=4	6NHCl	+40.7°
L-Leu	C=4	6NHCl	+15.1°
L-Lys·HCl	C=8	6NHCl	+21.2°
L-Met	C=8	4 to 6NHCl	+24.2°
L-phe	C=2	H ₂ O	-34.3°
L-pro	C=4	H ₂ O	-84.8°

○ 強酸溶液下での比旋光度（この領域で比旋光度について論じたのは本研究において初めてである）強酸側においてはアミノ酸全般に共通して比旋光度は急激に低下してくる。（Fig.13）この原因として紫外部吸収スペクトル（phe 使用）及ラーマンスペクトルよりカルボキシル基のカルボニルへのプロトン化によることを証明することができた。

（Fig.14, Fig.15）

又、これ等から Ileu, Leu, Val は酸濃度 2.0 N 近傍にて安定な比旋光度を示し、その値は次の如くなる。

TABLE-9 カチオンとして安定領域での Ileu, Leu,
Val の比旋光度

	安 定 領 域		旧 法	
	$[\alpha]_D^{20}$	測定条件	$[\alpha]_D^{20}$	測定条件
L-Ileu	+ 4 2.6 °	C=4, 20N H ₂ SO ₄	+ 4 0.7 °	C=4, 6NHCl
L-Leu	+ 2 2.3 °	" , "	+ 1 5.1 °	" , "
L-Val	+ 3 7.5 °	" , "	+ 2 8.0 °	" , "

○ X線, 赤外線吸収スペクトル

各種イオン型での3つの塩基性アミノ酸のラセミ体についてラセミ混合物かラセミ化合物かの検討を行つた結果、DL-His·HCl·H₂O はラセミ混合物であり、その他はラセミ化合物であることが判明した。

以 上

Fig. 1 脱色樹脂におけるアミノ酸の吸着曲線

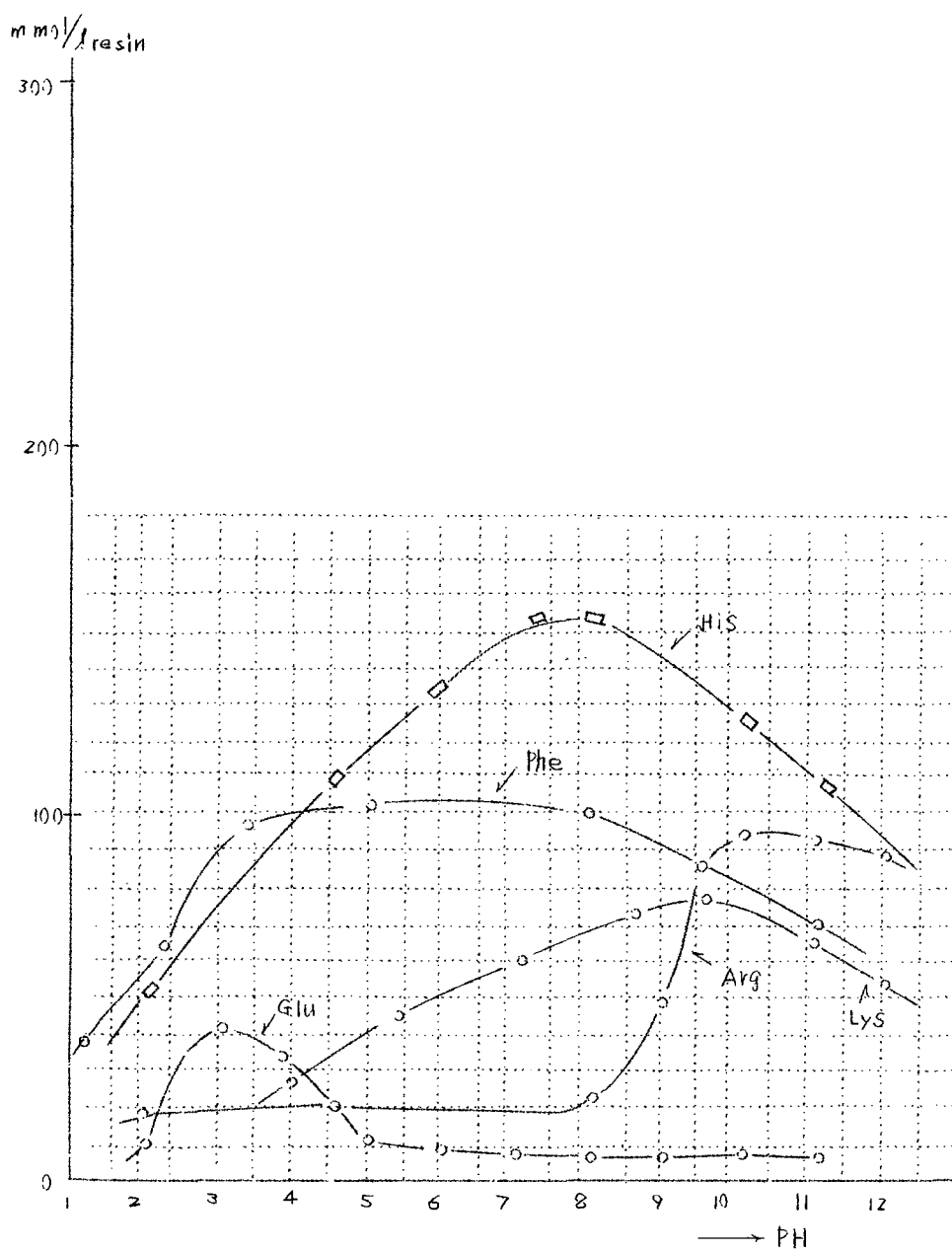
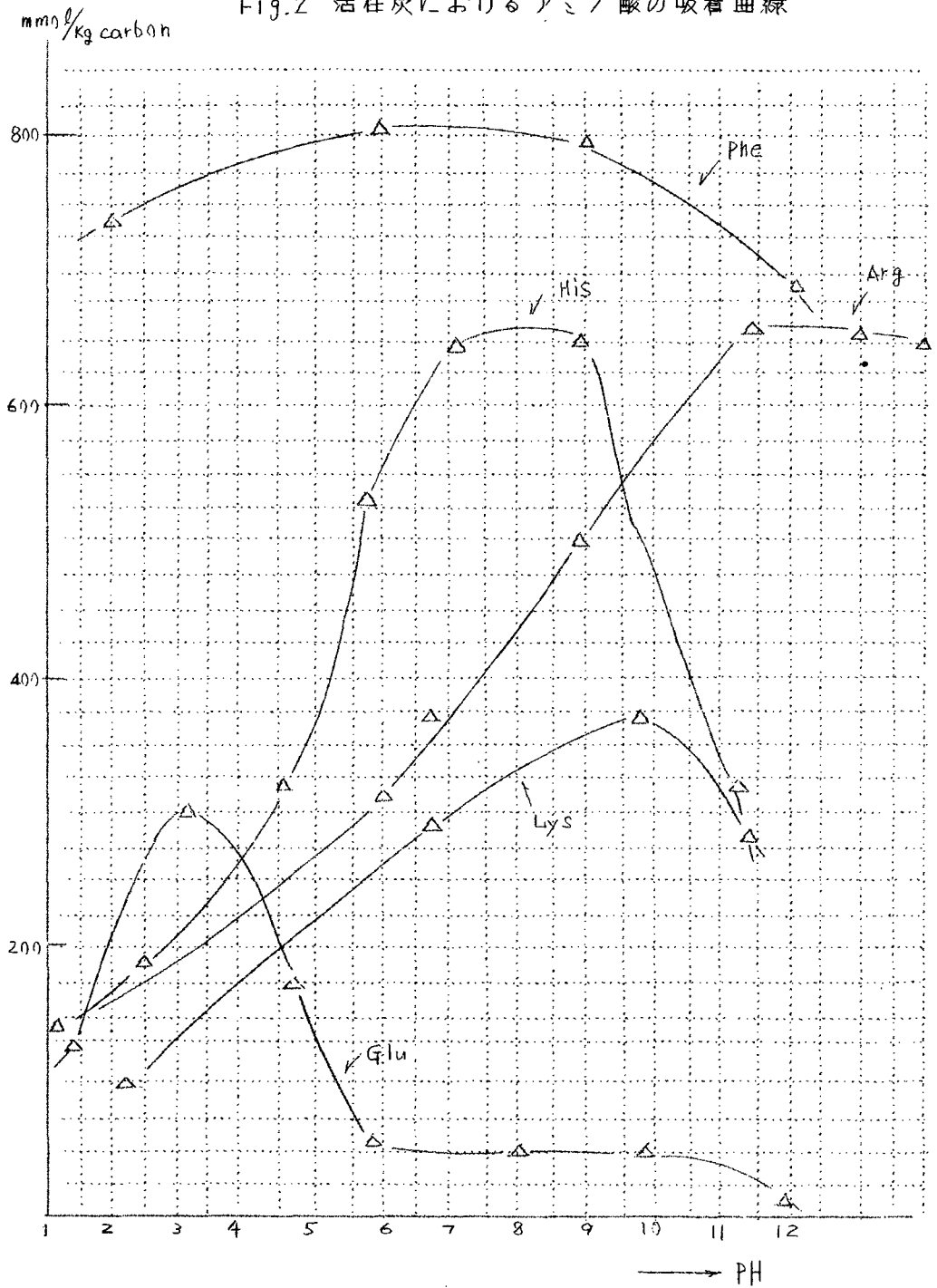


Fig.2 活性炭におけるアミノ酸の吸着曲線



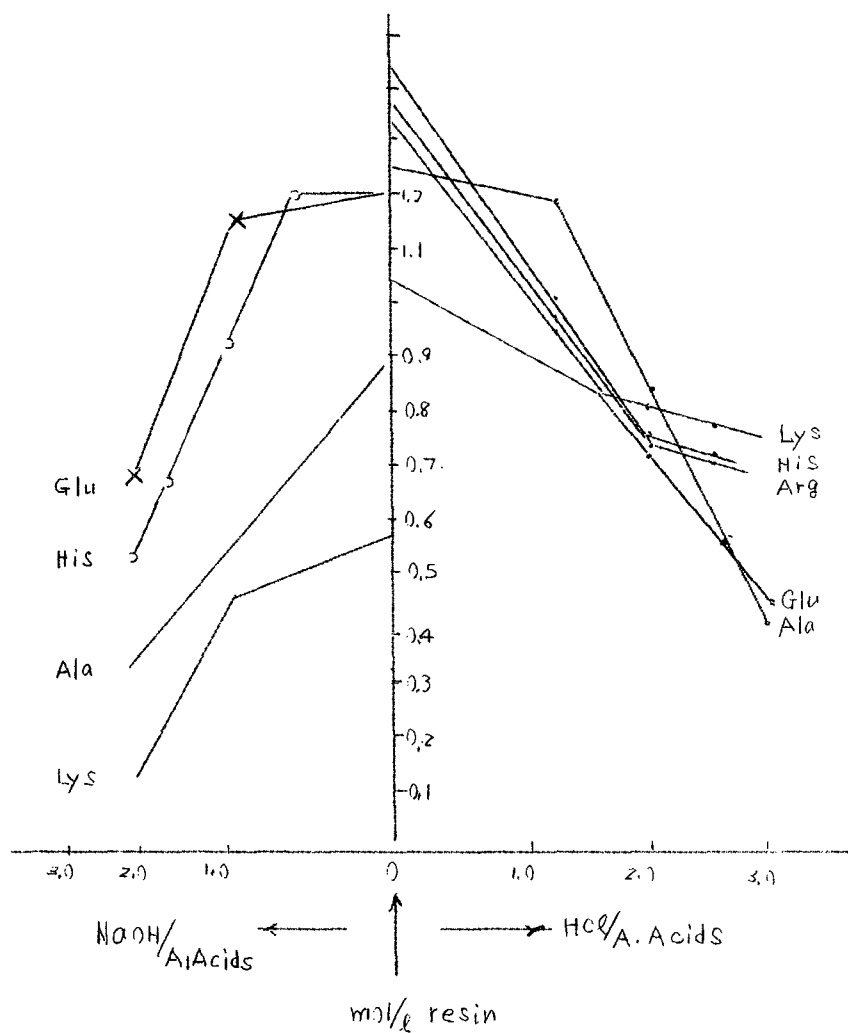


Fig3-1 Duolite A-102 におけるアミノ酸の吸着に及ぼす苛性ソーダの影響

Fig3-2 Duolite C-25 におけるアミノ酸吸着に及ぼす塩酸の影響

Fig. 4 は 頁に示す

Fig. 3-3 樹脂に於けるアミノ酸吸着に及ぼす酸
アルカリ(PH)の影響, (モデル曲線)

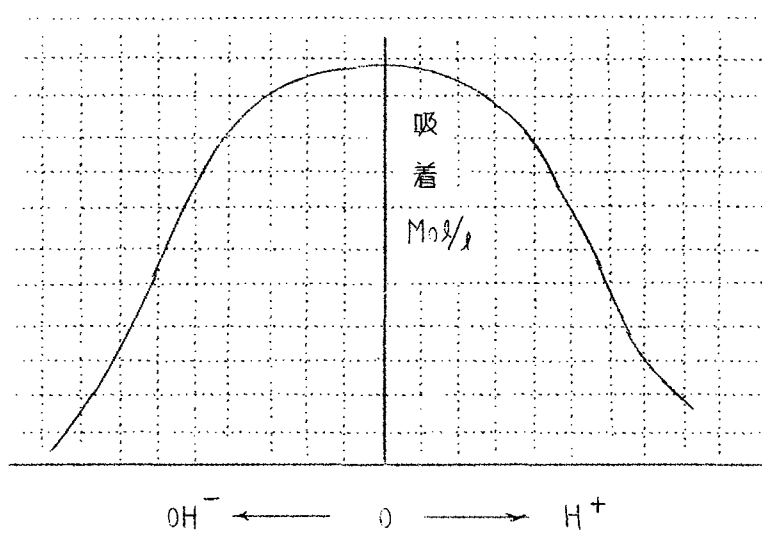


Fig. 5 L-His DL-His, H₂O 三成分不均一系平衡
(30°C)

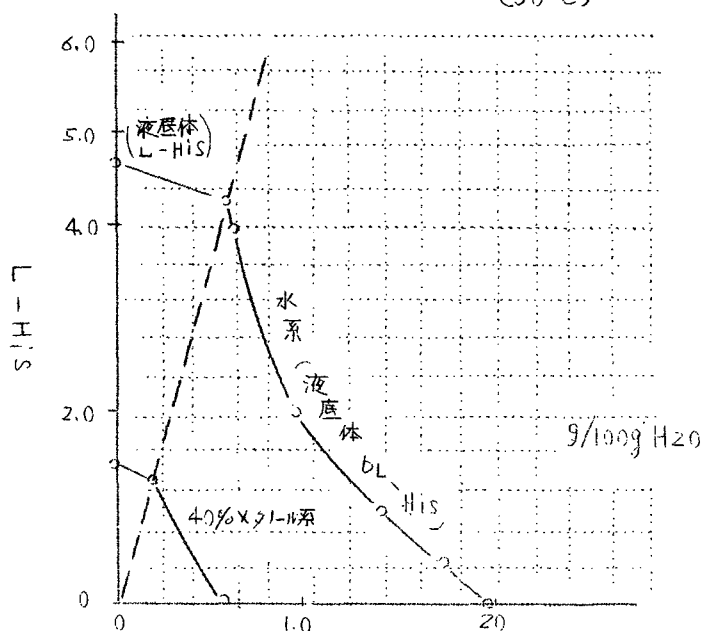


Fig. 6 L-His·Hcl, DL-His·Hcl, H₂O 三成分不均一系平衡

(30°C)

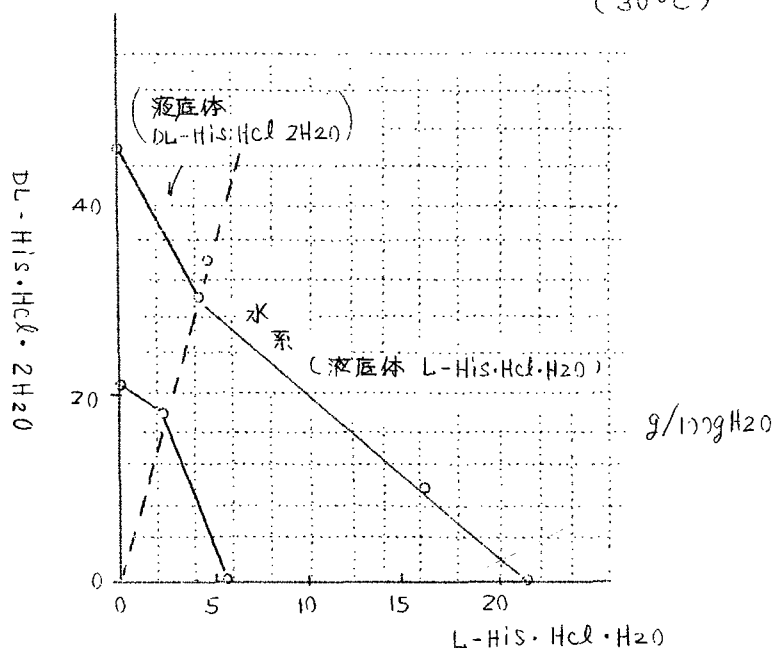


Fig. 7 Argのイオン型の消長

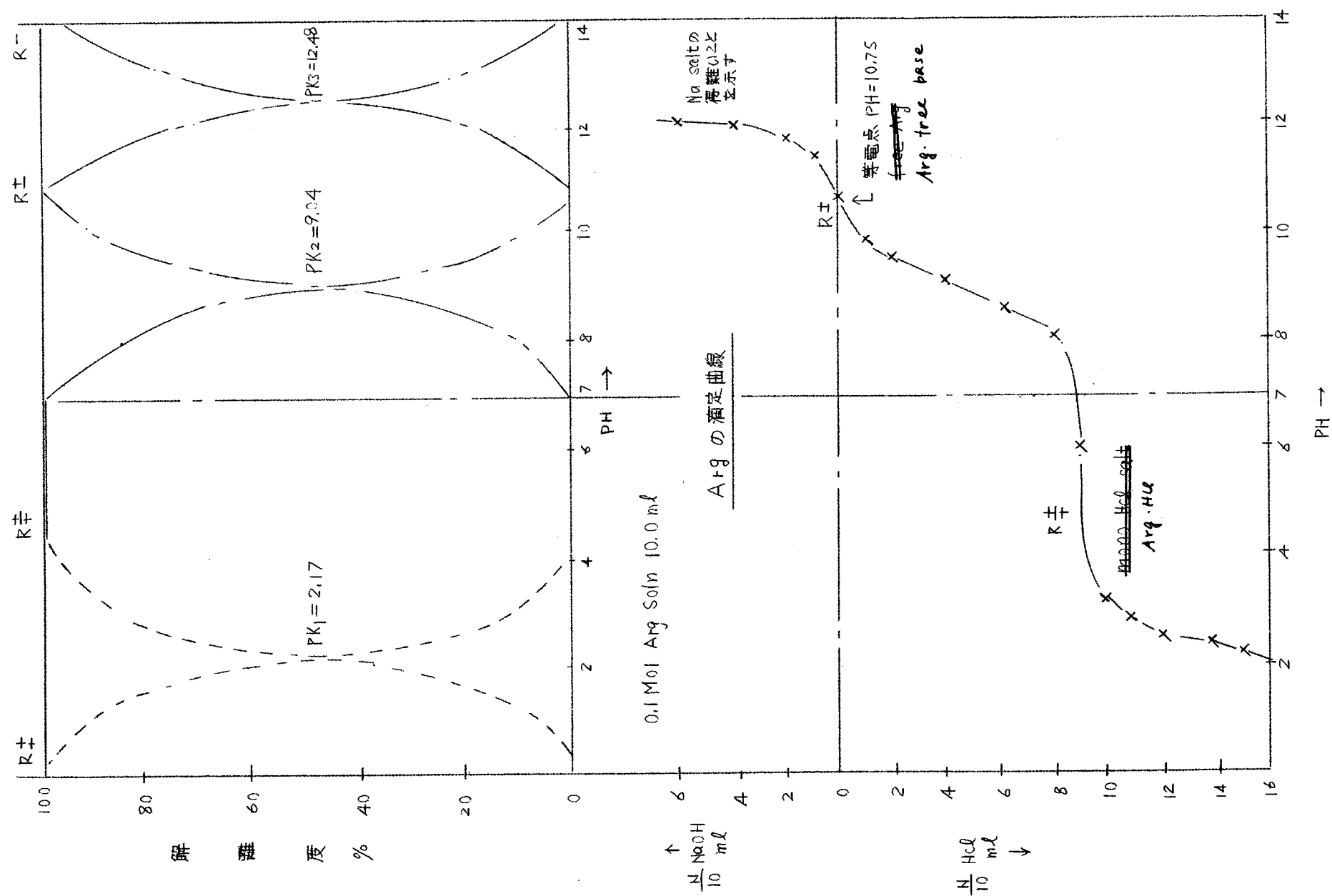


Fig. 8 酸及びアルカリに対する L-Glutamic acid の溶解度
(g/100g 溶媒, 35°C)

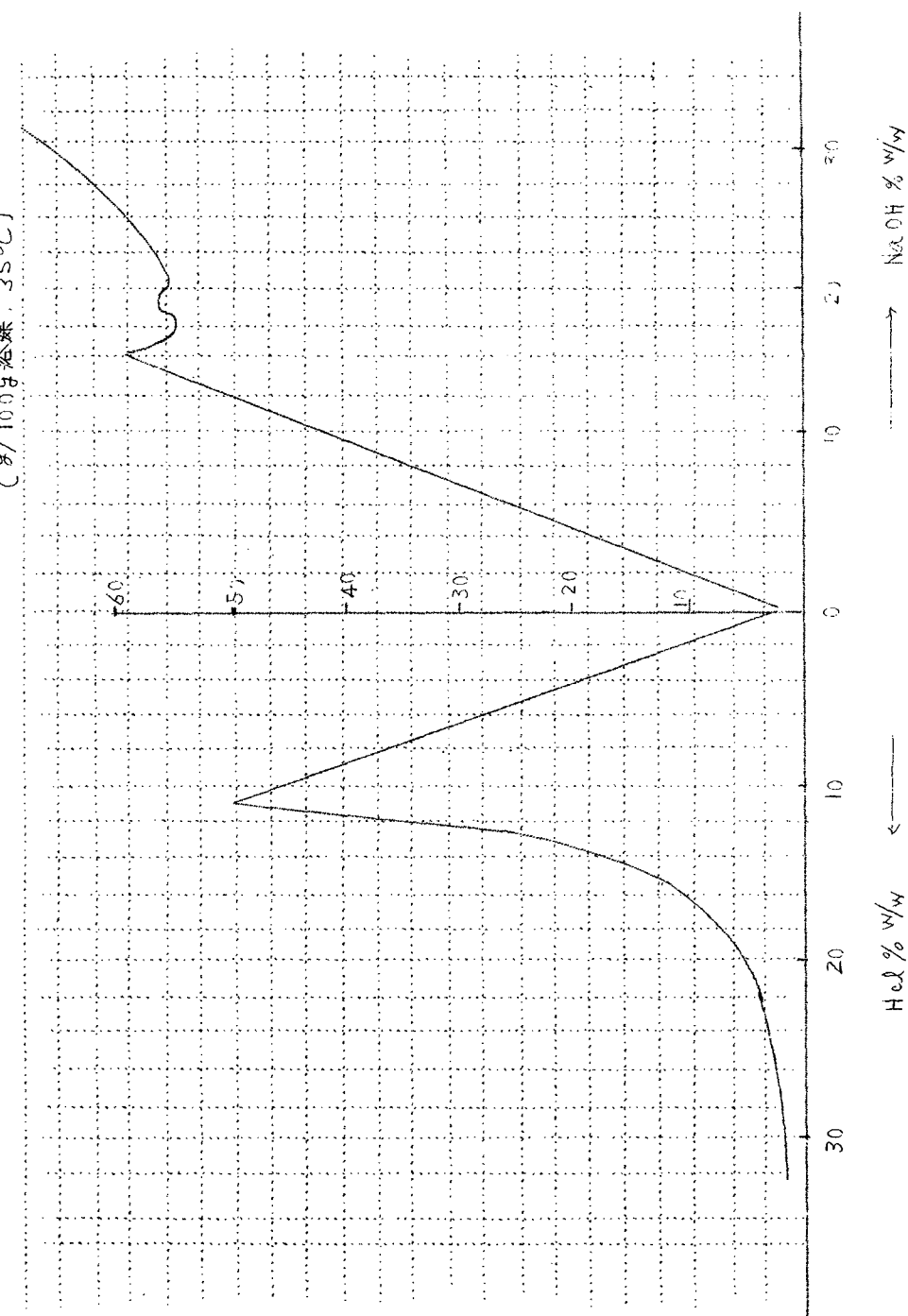


Fig. 9 酸及びアルカリに対する L-Leucine の
溶解度 (g/溶媒 100g)

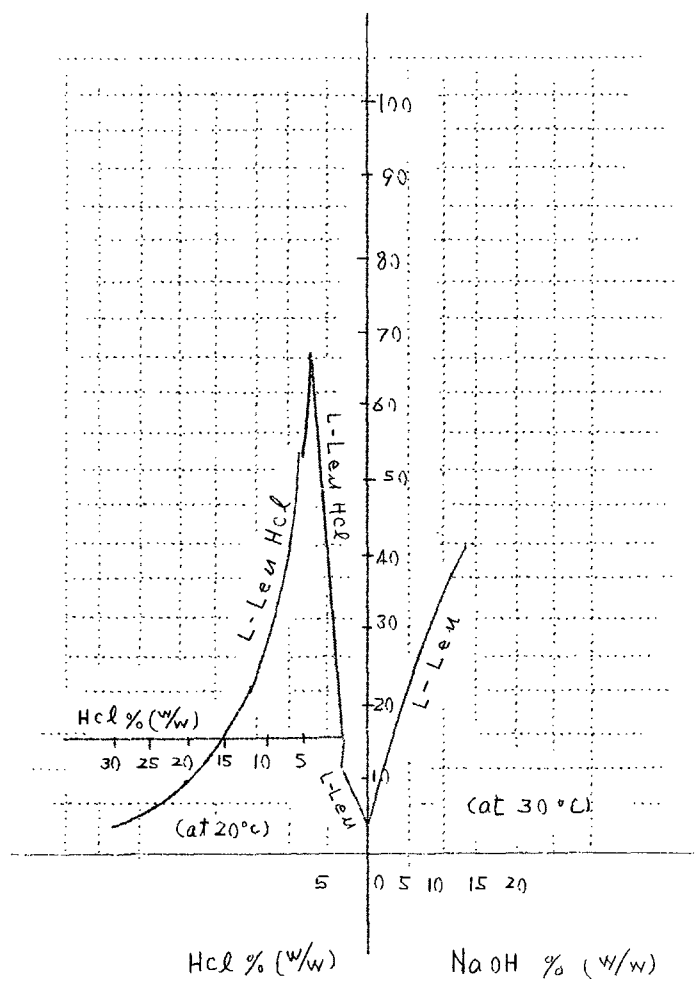


Fig.10 酸及びアルカリに対する L-Histidine の
溶解度 (g / 溶媒 100 g , 30°C)

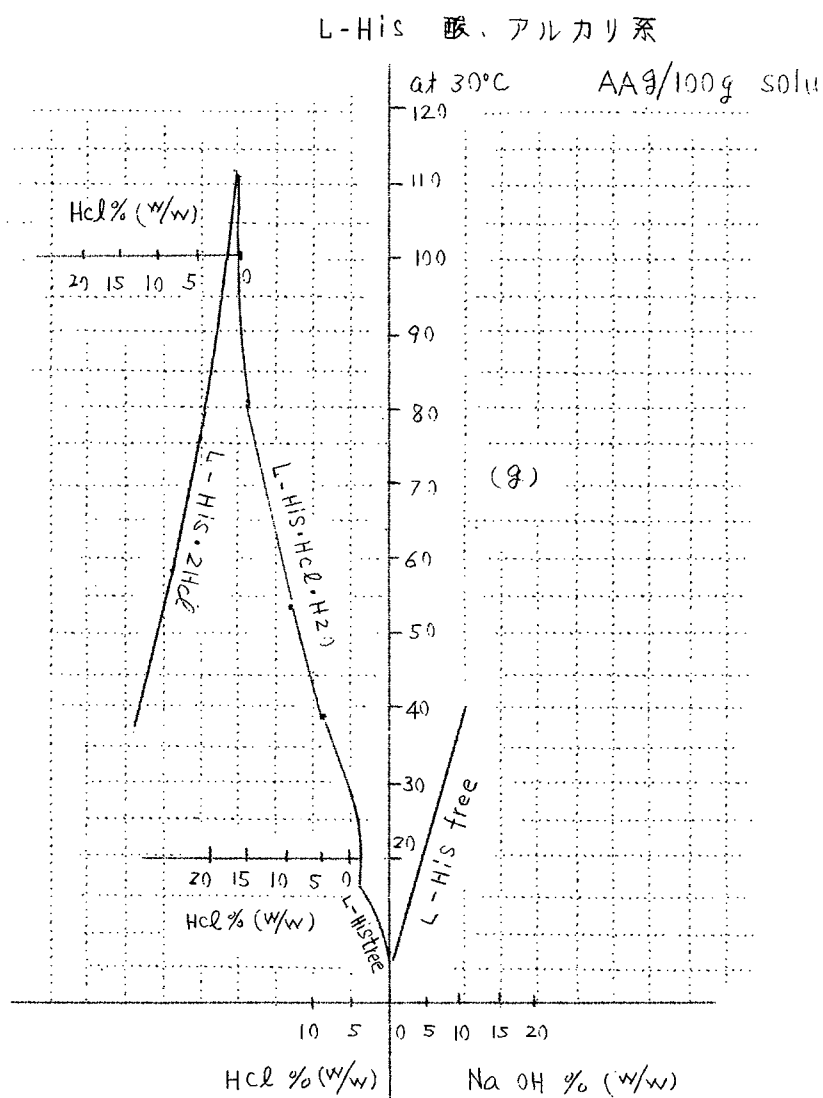


Fig. 11 L-Arg·2H₂Oの示差熱分析曲線 (フッ石水型)

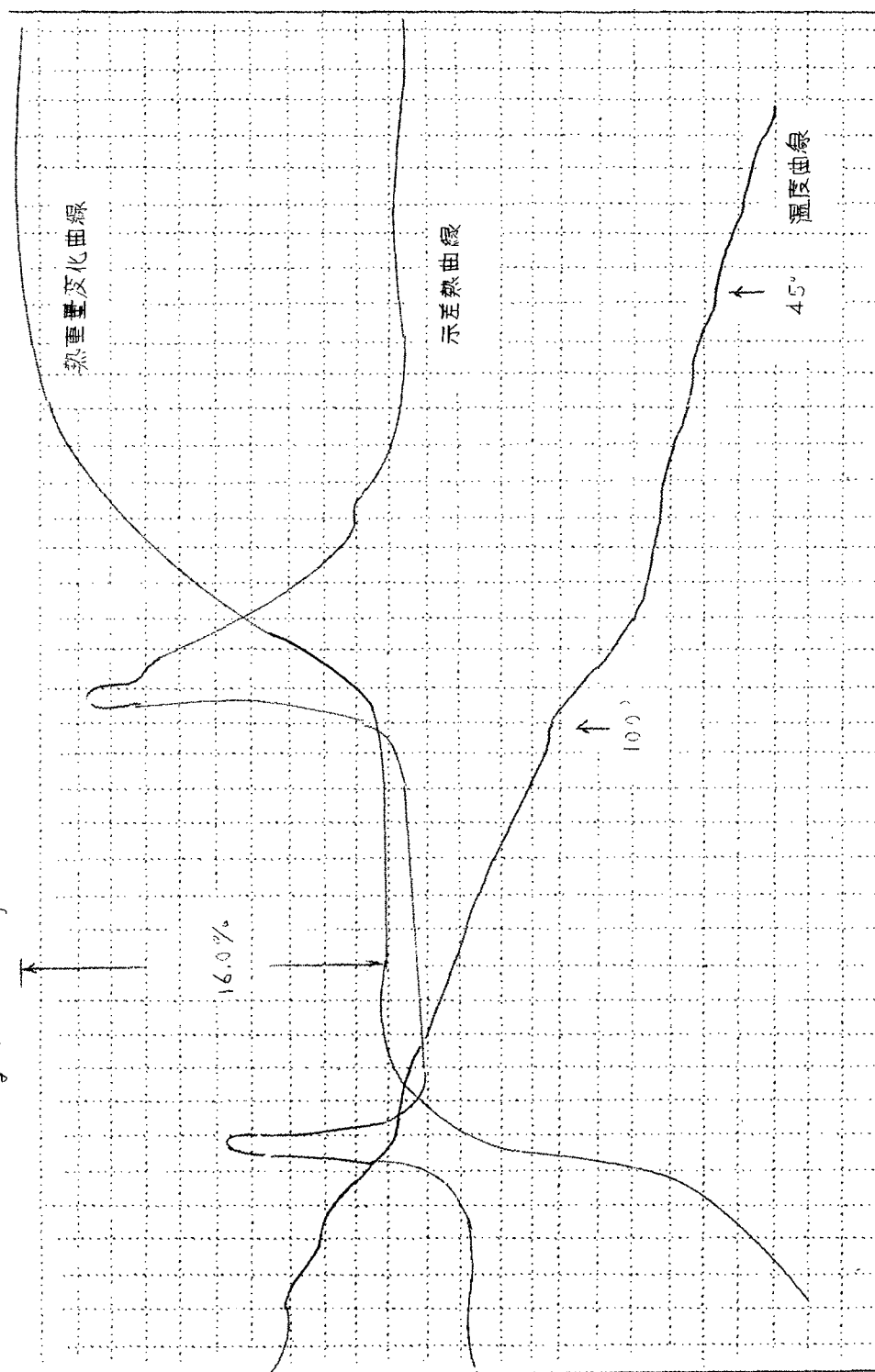


Fig-12 DL-HisHCl·2H₂O の示差熱分析曲線 (硫酸銅型)

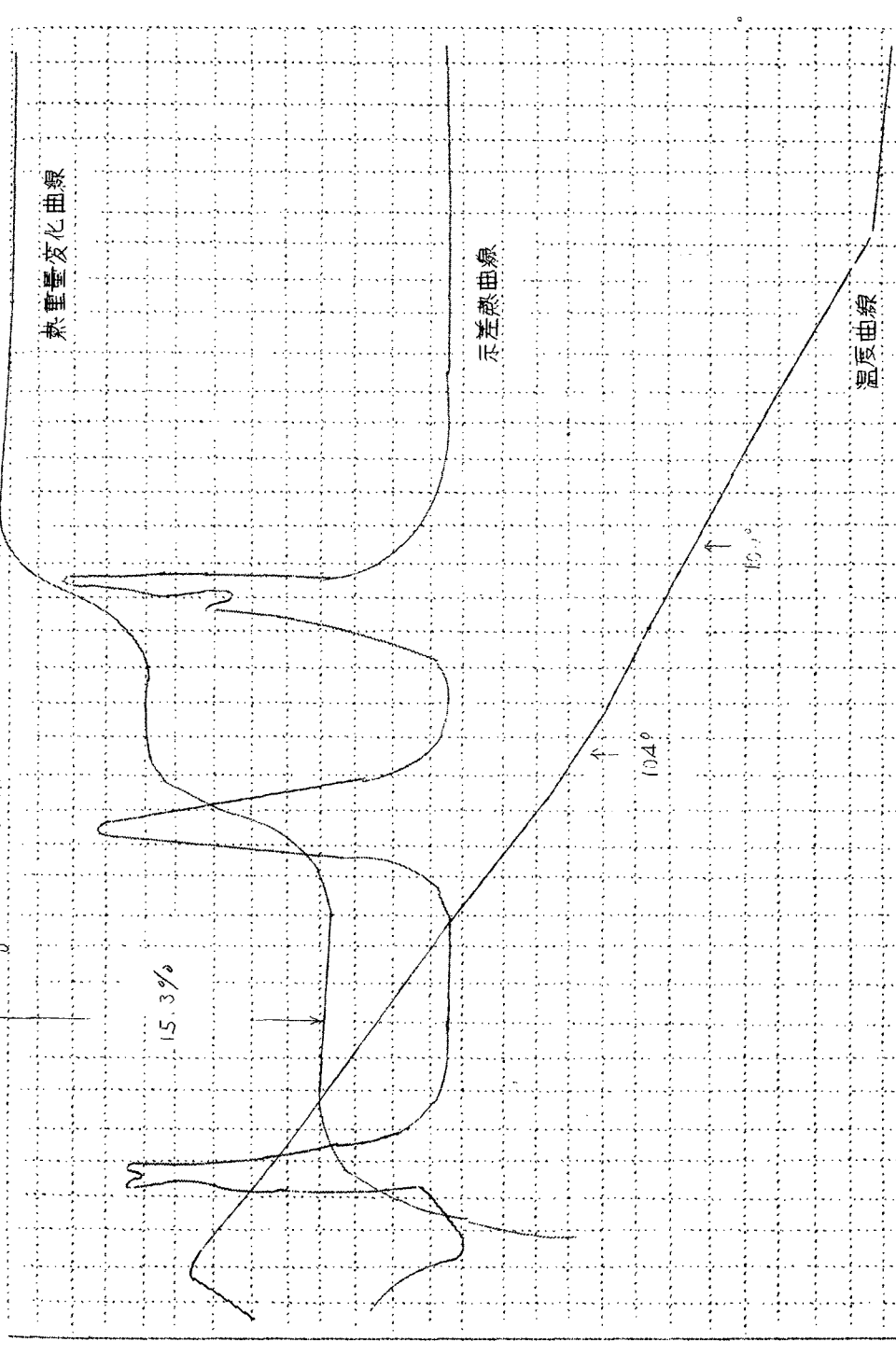


Fig. 13 L-Phenylalanine $[\alpha]_D^{25}$
C = 5

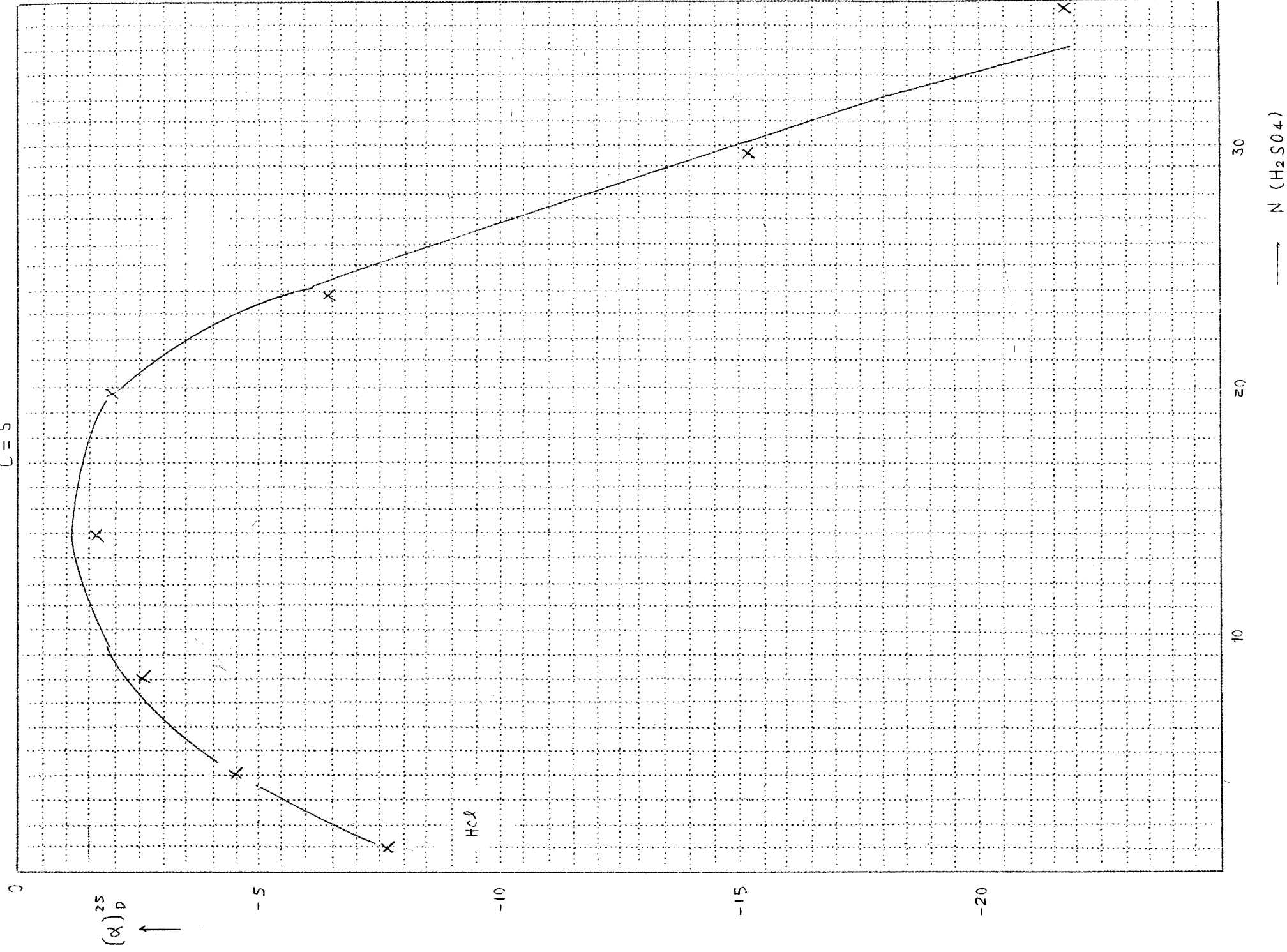


Fig.14 L-PHeの紫外吸収スペクトル

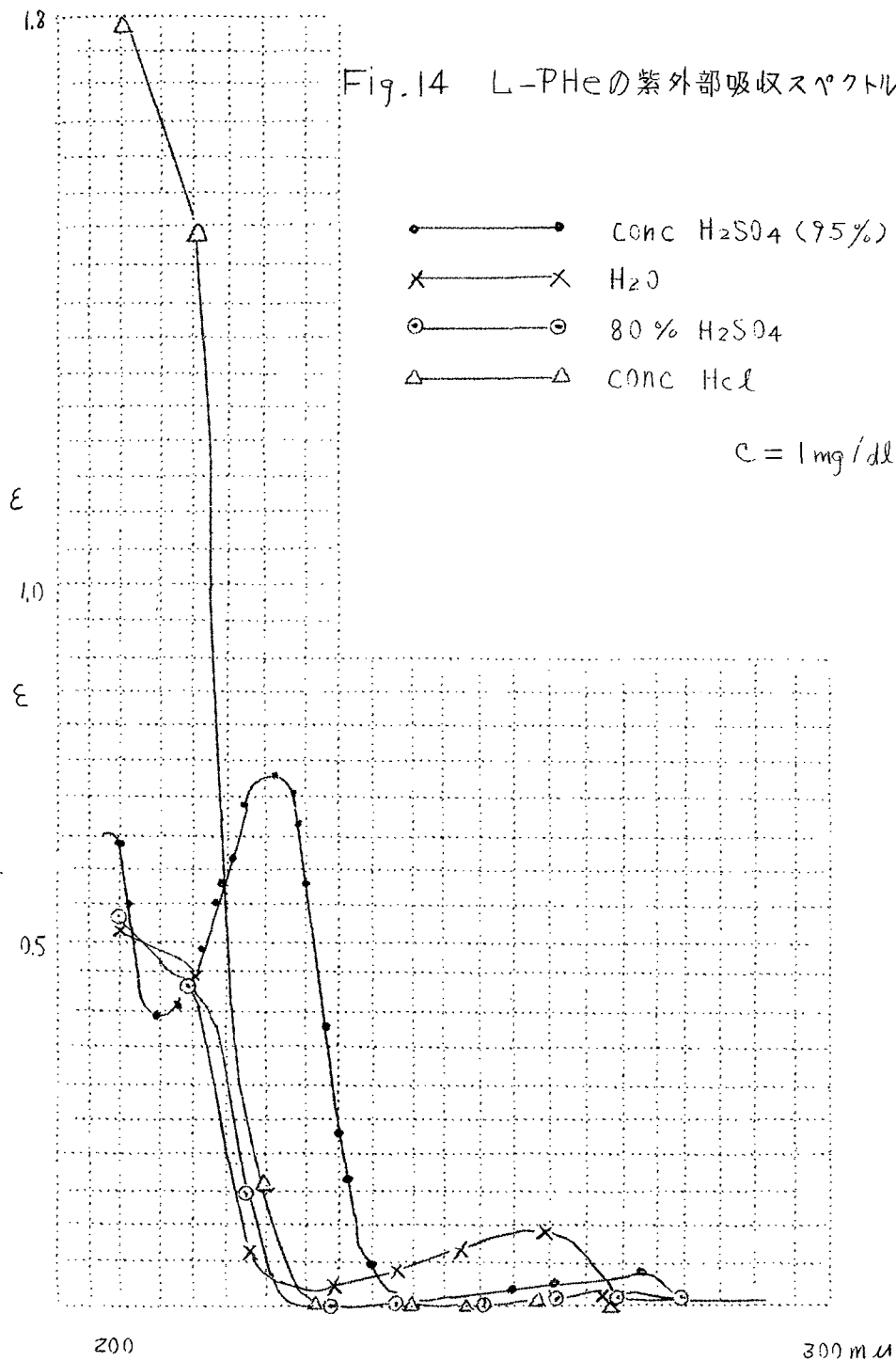
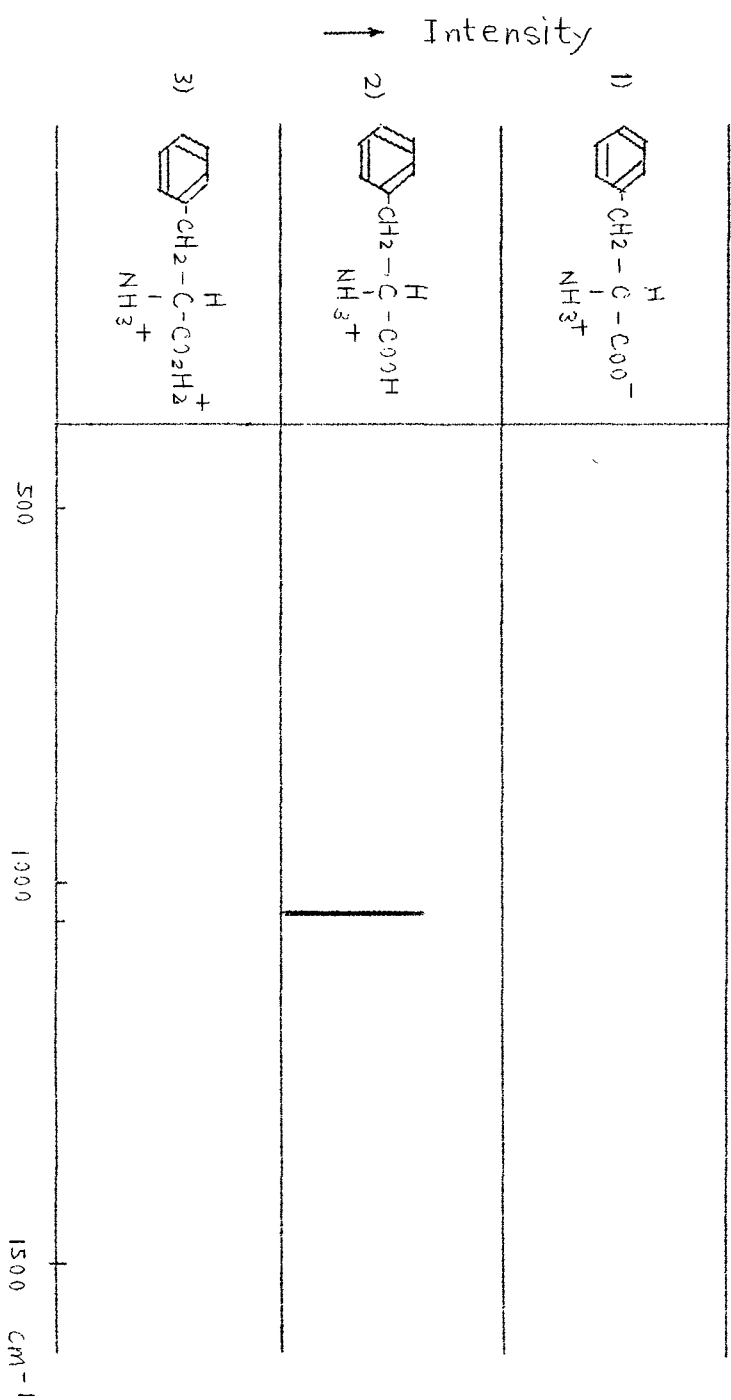


Fig. 15 Raman spectra of L-Phenylalanine

- 1) aqueous solution
- 2) 9N sulfuric acid
- 3) 36N sulfuric acid



審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、高純度の塩基性アミノ酸を工業的規模において天然蛋白質より分離精製することを目的として、分離法の基礎的研究および得られたアミノ酸の純度検定法について特に詳細に研究されたものである。

塩基性アミノ酸は、医薬、食品、飼料などの利用面において大量に消費されているが、本研究が開始された当時においては、蛋白質加水分解液より塩基性アミノ酸を系統的に分離調製する工業的方法は、全く確立されていなかった。著者は、その方法としてイオン交換樹脂法を選び、各種の樹脂についてアミノ酸の交換能を広く比較検討した、その結果、強酸性樹脂を使用して塩基性アミノ酸区分を粗分離した後、弱酸性樹脂を系統的に使用することによって、リジン、アルギニンおよびヒスチジンの3種のアミノ酸の効率のよい単離にはじめて成功した。この過程において、塩基性アミノ酸区分を他の中・酸性アミノ酸より分離するには、アミノ酸相互の樹脂に対する親和力の差を利用したいわゆる押し出し方式を応用し、また弱酸性樹脂の溶出には、従来あまり使用されていなかったアンモニアが、極めて有効な溶出剤であることを明らかにした。本研究によって確立されたイオン交換樹脂による分離法は、現在塩基性アミノ酸の工業的生産に広く用いられている。

このようにして得た各塩基性アミノ酸の粗結晶は、非天然型のD-型アミノ酸を2%程度含有することが著者により新しく確認された。したがって、つぎに、各アミノ酸の光学的精製法の研究が必要となり、著者は、その基礎となる各アミノ酸の物理化学的性質について詳細な研究を行った。塩基性アミノ酸の各種結晶型の溶解度をはじめて決定し、また結晶水の性質について示差熱天秤分析により脱水温度および結晶水の型を明らかにした。また旋光度はアミノ酸の純度を決定する重要な特性であり、著者は17種のアミノ酸について各種の条件下での比旋光度について実験を行った。その結果、アミノ酸の推奨すべき比旋光度の測定条件を定めた。また、X線回折法、赤外線吸収スペクトル法による塩基性アミノ酸の分析についても研究し、これらの方法から塩基性アミノ酸結晶のラセミ混合物とラセミ化合物の判定を行った。

以上、本研究は、塩基性アミノ酸のイオン交換樹脂による工業的分離法の基礎をはじめて確立し、さらに分離したアミノ酸の精製法について、物理化学的方法を導入して高純度の結晶を調製することに成功した。本論文は、アミノ酸化学の基礎研究に寄与すると共に、アミノ酸工業上にも重要な価値があるものと考え、論文審査委員一同は、著者に農学博士の学位を授与するに充分な価値あるものと判定した。